

동백나무 추출물의 혈전용해 효소활성

임채영* · 이숙영**† · 표병식*** · 김선민***

*동신대학교 생물자원산업화지원센터, **조선대학교 단백질소재연구센터, ***동신대학교 한약재산업학과

Fibrinolytic Enzyme Activity of Extract from *Camellia japonica* L.

Chae Young Lim*, Sook Young Lee**†, Byeong Sik Pyo***, and Sun Min Kim***

*Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University, Naju Jeonnam 520-811, Korea.

**Research Center for Proteineous Materials, Chosun University, Gwangju 501-759.

***Department of Oriental Medicine Material, Naju Jeonnam 520-811, Korea.

ABSTRACT : The fibrinolytic activities of soluble proteins extracted from young leaves of *Camellia japonica* L. were studied. Fibrinolytic activity of extract from partitions of *C. japonica* L. showed 1.6-2.0 times higher than plasmin used as positive control. The fibrinolytic enzyme was confirmed directly from young leaves of *C. japonica* L. by a fibrin plate and fibrin zymography. The protein was composed of a single polypeptide and its apparent molecular weight was found to be 45 kDa, as judged by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature for the fibrinolytic activity were pH 5.5 and 30 °C, respectively. Also, the fibrinolytic activity was clearly inhibited by PMSF and TLCK, suggesting that it is a member of the trypsin-like serine protease. All these results suggest the protease is a fibrinolytic enzyme belong to a family of trypsin-like serine protease.

Key Words : *Camellia japonica* L, fibrinolytic enzyme, Protease activity, fibrinolytic activity, fibrin zymography

서 언

혈전용해효소는 동, 식물 그리고 미생물 등에서 분리되고 특성이 밝혀졌는데 혈액응고-용해계에 영향을 미치는 인자는 주로 뱀독에서 분리되었다 (Holden, 1990). 지금까지 사용되고 있는 혈전용해제로는 plasminogen 활성화제로써 urokinase, tPA, streptokinase (Mullertz and Lassen, 1953; Reed *et al.*, 1995; D'Costa and Boyle, 1998)등이 있으나 urokinase를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없고 (Sumi *et al.*, 1985), tPA의 경우 반감기가 짧은 단점이 있으며, 이 용해제들은 혈전에 대한 선택성이 적어 전신출혈이 발생하며 또한 가격이 비싼 단점이 있다 (Kim, 1998). 이러한 plasminogen 활성화제들은 간접적으로 혈전을 용해하지만 혈전을 직접 용해하는 새로운 혈전용해제들이 계속 보고되고 있다. 최근의 혈전용해에 관한 연구로는 뱀독 (Koh *et al.*, 2001; Xiuxia *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2001), 미생물 (Kim *et al.*, 1997; D, Costa and Boyle, 1998), 조류 (Matsubara *et al.*, 2000) 곤충 (Park and park, 1998; Hahn *et al.*, 2001), 거머리 (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 1998), 그리고 지렁이 (Hrzenjak

et al., 1998; Fan *et al.*, 2001)등에서 분리 동정되고 특성이 보고되었다. Plasminogen 활성화제와 plasmin 유사 활성을 가진 이러한 제제들은 혈전용해 기작의 이해와 잠재적인 치료제로써 매우 유용하다고 할 수 있다.

최근 약용식물 및 생약 등으로부터 특정성분이나 천연물이 가지는 2차 대사산물인 생리활성 물질에 대한 관심이 증대되고 있다 (Tabance *et al.*, 2001). 그러나 식물에서는 혈전용해 효소의 분리, 동정 및 작용 특정성분에 대한 연구는 매우 부족한 실정이며, 기존의 혈전용해효소가 가지는 혈전에 대한 비특이적, 부작용, 고가 등의 단점을 해결할 수 있는 새로운 혈전용해 효소의 개발을 위한 연구가 식물에서도 활발히 진행되고 있다. 동백나무 (*Camellia japonica*)는 동백나무과(Theaceae), 동백속 (Camelliae)에 속하는 상록교목으로 주로 남해안과 도서지역과 서쪽으로는 대청도와 동쪽으로는 울릉도까지 분포하며, 특히 전남지역이 전국 식재 면적의 67%를 차지하고 있다. 동백나무에 대한 연구는 항산화 물질, 항균물질 (Lee *et al.*, 2004) 및 여러 약효성분을 확인 (Yoshikawa *et al.*, 1994)되고 있지만 혈전용해에 관련된 인자에 대한 연구는 극히 미미한 형편이다.

Corresponding author: (Phone) +82-62-230-7567 (E-mail) seedbank2001@hanmail.net

Received February 1, 2006 / Accepted July 28, 2006

따라서 본 연구는 새로운 혈전용해 효소개발을 위한 기초 연구로 차나무과의 식물로 최근 다양한 기능성을 가지고 있다고 알려진 동백나무 (*C. japonica* L.)로부터 혈전용해효소 생산성을 조사하고 동백나무의 유엽으로부터 조효소용액을 추출하여 fibrin zymography와 fibrin plate 법을 이용하여 혈전용해 효소의 활성과 부분적인 효소의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 식물종자 및 시약

본 실험에 사용한 동백나무의 종자 및 잎은 전남 장흥군 천관산의 동백자생 근각지에 있는 야생 동백나무의 유엽을 4-5월에 채취하여 동결건조 (Freeze dryer, Samwon Co.)하여 사용하였다.

2. 조효소용액의 제조

동백나무의 어린 잎 10 g을 40 ml의 20 mM Tris-Cl buffer (pH 7.4)을 첨가하여 4°C의 cold chamber 내에서 막자사발로 분쇄하여 균질화한 후, 6500 rpm 4°C에서 30분간 원심분리 한 다음 상층액을 조효소용액으로 사용하였다.

3. 황산암모늄 분획

동백의 조효소용액으로부터 혈전용해효소를 확인하고 농축하기 위하여 황산암모늄을 30%로 천천히 포화시켜 4°C에서 하룻밤 동안 교반한 다음 10,000 rpm으로 4°C에서 1시간 동안 원심분리하여 회수된 상층액에 황산암모늄을 80%로 포화시켜 4°C에서 다시 하룻밤동안 교반한 다음 10,000 rpm으로 4°C에서 1시간동안 원심분리 하였다. 침전물을 20 mM Tris-Cl buffer (pH 7.4)에 용해하고 불순물을 제거하기 위해 12000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하여 30-80% 황산암모늄 분획으로 사용하였다

4. 효소의 활성

1) 단백질분해 효소활성

단백질 분해활성은 azocasein이 분해되어 나오는 azo기의 양을 측정함으로써 단백질 분해 활성을 판정하는 azocasein 법 (Patton *et al.*, 1993)을 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 1% azocasein (20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4) 300 μ l에 각각의 측정시료를 50 μ l 넣고 37°C의 항온수조에서 30분간 반응시킨 후, 미리 차게 한 10% (W/V)의 TCA용액을 600 μ l을 넣고 즉시 혼합하였다. 시료들은 10분 동안 얼음에 놓아두어 반응을 정지시킨 다음, 원심분리하고 상층액을 분리하여 366 nm에서 흡광도를 측정하고 azocasein 표준곡선을 이용하여 단백질 분해활성을 환산하였다.

2) 혈전용해 효소활성

혈전용해 효소활성의 측정은 fibrin plate 법 (Astrup and Mullertz, 1952)을 약간 변형하여 혈전용해 효소인 plasmin을 표준시료로 하여 측정하였다. 즉, 20 mM Tris-Cl buffer (pH 7.4)로 fibrinogen의 최종농도가 0.12%가 되도록 완전히 용해한 다음, 그 용액 5 ml에 0.1 ml의 100 NIH U/ml의 thrombin 용액을 첨가하여 잘 혼합한 다음, 동일한 완충용액으로 만든 1.2% agarose 용액을 5 ml 첨가하여 다시 잘 혼합하고 petri-dish에 부어 상온에 30분간 방치하여 fibrin clot을 형성시켜 fibrin-agarose plate를 제조하였다. 그리고 나서 구멍을 뚫어 10 μ l의 각각의 시료를 떨어뜨린 후 37°C에서 18시간 반응시키고 난 다음 형성된 투명한 직경을 표준시료인 plasmin과 비교하여 측정하였다.

5. 단백질 정량

단백질 정량은 Bradford법 (1976)에 의해 단백질 정량 Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 OD₇₅₀에서 흡광도를 측정하였으며 표준시료로는 Bovine serum albumin (BSA)를 사용하였다.

6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

단백질의 전기영동은 Laemmli 방법 (1970)을 약간 변형한 12% SDS-PAGE상에서 수행하였다. 시료는 환원성상태의 sample buffer에서 2-mercaptoethanol을 제외한 비환원 sample buffer를 이용하여 non-reducing 조건에서 전기영동 하였고 혈전용해효소의 분자량은 표준단백질을 이용하여 상대적인 이동도인 Rf 값과 분자량의 semi-logarithmic plot에 의하여 결정하였다.

7. Fibrin zymography

Fibrin zymography는 Kim *et al* 방법(1998)에 의하여 수행하였다. 즉, 0.12% fibrinogen과 100 μ l의 thrombin 용액 (100 NIH U/ml)을 함유한 12% polyacrylamide gel에 20 μ g의 시료를 zymogram sample buffer (5X)와 혼합하여 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 2.5% Triton X-100을 함유한 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)에 상온에서 30분간 고정한 다음 증류수 세척하고 다시 효소반응 완충용액에 넣어 37°C에서 12시간 반응한 다음 염색하고 탈색하여 확인하였다. 그리고 혈전용해효소에 해당하는 부분의 단백질을 추출하여 효소의 부분적 특성을 조사하였다

8. 효소의 부분적 특성

1) 각종 저해제의 영향

일반적인 protease 저해제로 알려진 PMSF, EDTA, TLCK, TPCK, DTT등을 1 mM의 농도로 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 용액으로 제조한 다음 추출효소를 첨가하여 37°C에서 1시간

Table 1. Protease and fibrinolytic activities of total soluble proteins 30 to 80% fractionated by ammonium sulfate from various partitions of *C. japonica* L.

Partitions	Total protein (mg)	Total activity (mU)	Specific activity (mU/mg)	Fibrinolytic activity (mU)
Seeds	1.8942	107,075	56,528	52
Envelop of seeds	1.0559	66,248	62,741	34
Young leaves	4.0419	15,792	3,907	12
Adult leaves	1.0325	2,004	1,941	9

동안 반응시켜 효소활성을 측정하고 fibrin zymography와 fibrin agarose plate에 의하여 활성을 비교하였다.

2) 최적온도 및 온도안정성

온도에 따른 효소의 활성도 변화를 알아보기 위하여 30°C에서 80°C까지 5°C의 간격으로 각각 온도별로 1시간 반응시킨 후 azocasein assay와 fibrin plate를 수행하여 각각의 온도에 의한 단백질분해효소와 혈전용해효소의 활성변화를 측정하고 온도에 대한 효소의 안정성을 조사하였다.

3) 최적 pH 및 pH 안정성

pH에 따른 효소의 활성도 변화를 알아보기 위하여 3.5에서 10.0까지 0.5의 간격으로 각각 pH별로 1시간 반응시킨 후 azocasein assay와 fibrin plate를 수행하여 각각의 pH에 의한 단백질분해효소와 혈전용해효소의 활성변화를 측정하여 pH에 대한 효소의 안정성을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 효소 활성도의 측정

1) 단백질 분해 활성

모든 실험과정은 4°C에서 수행하였으며, 추출된 전체 수용성 단백질과 효소활성의 비를 Table 1에 나타내었다. 그 결과 각각 동백의 종자, 종피, 유엽 그리고 성엽의 수용성 단백질이 효과적으로 추출되어 농축되었음을 알 수 있었다. 혈전 분해효소는 단백질분해효소의 일종으로 주로 serine protease나 metallo-protease로 알려져 있어 혈전분해 활성을 검증하기 위해서는 단백질분해 활성 검증이 선행되어야 한다. 따라서 각각의 동백의 종자, 종피, 유엽 그리고 성엽으로부터 추출한 수용성 단백질로부터 Azocasein 법을 이용하여 단백질 분해활성을 조사하였는데 그 결과 농축된 전체 단백질의 양에 비하여 비활성이 각각 종자는 56.528 units/mg, 종피는 62.741 units/mg, 유엽은 3.907 units/mg 그리고 성엽에서는 1.941 units/mg로 나타나 전체 수용성 단백질의 양에 대한 단백질 분해효소의 비활성이 종자와 종피에서 유엽과 성엽의 단백질분해효소의 활성에 비하여 약 20-33배 높은 활성을 나타내었다.

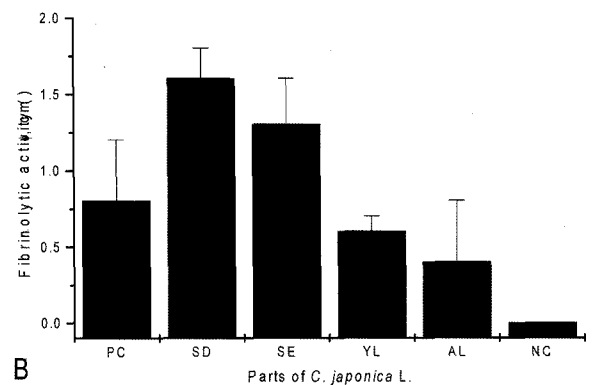
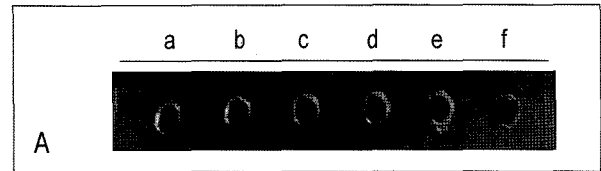


Fig. 1. Fibrinolytic activity on the fibrin agarose plate from partitions of *C. japonica* L. A, fibrin agarose plate; B, fibrinolytic activity. a, plasmin (0.01 U) designated PC as positive control; b and SD, seeds.; c and SE, envelope of seeds; d and YL, young leaves; e and AL, adult leaves; f, 20 mM Tris-Cl buffer(pH 7.4) designated NC as negative control.

2) 혈전분해 효소활성

각각의 종자, 종피, 유엽, 그리고 성엽의 추출물에 대한 혈전분해 활성은 fibrin agarose plate를 이용하여 각각의 추출물에 의하여 투명환을 형성함으로써 확인할 수 있었으며, 기존의 혈전용해제인 plasmin을 양성 대조구로 그 활성을 비교하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 대조구로 사용한 정제된 혈전용해 효소인 plasmin과 비교 하였을 때 종피와 종자에서 약 1.6-2.0배의 높은 활성을 나타내었으며, 유엽과 성엽의 효소 활성은 plasmin과 비교하였을 때 상대적으로 그 활성이 낮게 나타났다. 또한 종자와 종피의 효소 활성은 유엽과 성엽의 효소 활성에 비하여 상대적으로 약 1.8~3.8배의 강력한 혈전용해 활성을 나타내었으나 유엽과 성엽에서는 전체 단백질에 비하여 상대적으로 낮은 혈전용해 활성을 나타내었다.

2. SDS-PAGE 및 fibrin zymography

전체 수용성 단백질에서 혈전용해 효소를 확인하고, 분리하

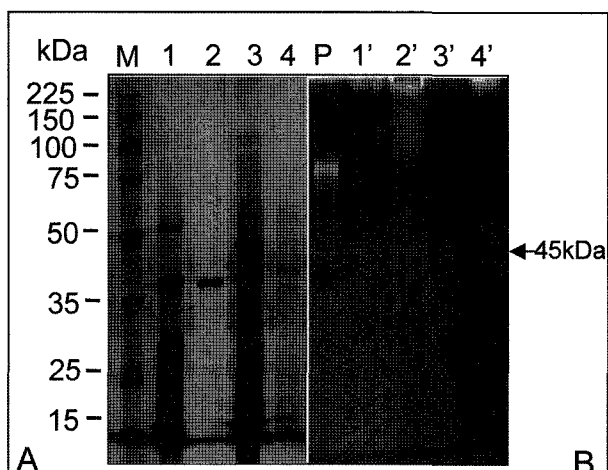


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and fibrin zymography from partitions of *C. japonica* L. A, SDS-PAGE; Lanes, M, protein molecular weight markers; P, plasmin (0.01 U) as positive control; 1 and 1', seeds; 2 and 2', envelope of seeds; 3 and 3', young leaves; 4 and 4', adult leaves. B, Zymogen analysis of crude extracts for activity staining. Electrophoresis was performed with 12% SDS-polyacrylamide gel containing 0.12% fibrinogen and 100 NIHU/ml thrombin. Activity was detected by incubation at 37°C for 12 hr.

기 위하여 종자, 종피, 유엽 그리고 성엽의 추출물로부터 non-reducing 조건의 PAGE를 행하고 fibrin zymography를 수행한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 추출물 모두에서 활성이 나타났으며, 이는 plasminogen activator (t-PA)나 urokinase 같은 fibrin clot에 간접적으로 작용하는 효소와는 달리 동백의 혈전용해 효소는 fibrin clot에 직접적으로 작용하는 혈전용해 효소일 것으로 생각된다.

3. 효소의 특성

1) 효소의 분자량

동백유엽의 혈전용해 효소를 30-80%의 황산암모늄으로 포화하여 농축한 다음, 동백 혈전용해효소의 단일성 확인과 분자량 측정을 위해 SDS-PAGE와 fibrin zymography를 수행한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 혈전용해 효소임을 확인하였고, 동백의 혈전용해효소 분자량은 38 kDa의 주된 단백질이 아닌 약 45 kDa의 미량 단백질을 알 수 있었으며, 이와 같은 결과는 동백과 같은 식물류의 시료 조효소액의 단백질분해 효소 활성이 일반적인 plate 측정법인 skim-milk plate에서 단백질 분해활성이 검출되지 않은 이유의 하나가 된다고 생각된다. 본 효소는 *Vipera lebetina*에서 분리한 뱀독 류의 fibrin clot에 직접 작용하는 혈전용해 효소인 lebetase의 분자량 약 22 kDa (Siigur *et al.*, 1998), *Agkistrodon piscivorus piscivorus*의 piscivorase I과 II의 분자량 각각 23과 29 kDa (Hahn *et al.*, 1995), *Agkistrodon saxatilis*의 혈전용해 효소 28 kDa (Koh *et al.*, 2001), *Agkistrodon acutus*의 혈전용해 효소 26

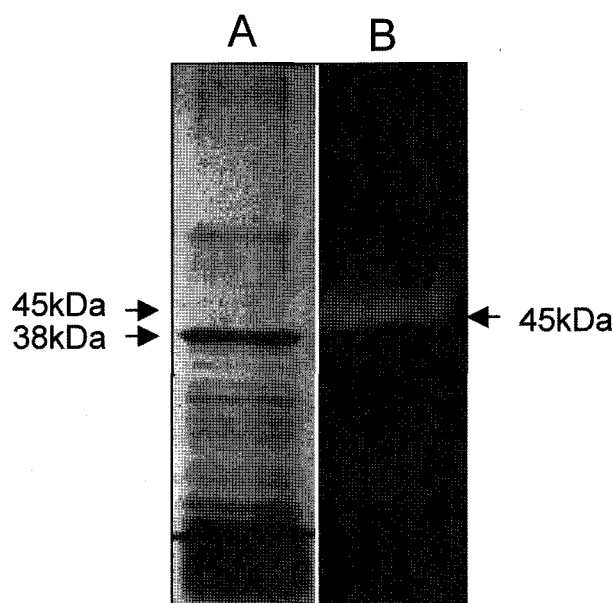


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and fibrin zymography of concentrates by 30-80% ammonium sulfate from young leaves of *C. japonica* L. A, SDS-PAGE; B, fibrin zymography. Electrophoresis was performed with 12% SDS-polyacrylamide gel containing 0.12% fibrinogen and 100 NIHU/ml thrombin. Activity was detected by incubation at 37°C for 12 hr.

kDa (Xiuxia *et al.*, 2001), 버섯류 *Tricholoma saponaceum*에서 분리된 혈전용해 효소 18 kDa (Kim, 2000), 미생물의 경우 42 kDa (Kim *et al.*, 1995), 일본 전통발효 식품에서 분리한 katsuwo kinase 35 kDa (Sumi *et al.*, 1995), 생선 젓갈에서 분리한 *Bacillus* sp. KA38 유래의 혈전용해 효소 41 kDa (Kim *et al.*, 1997), *Tenodera sinensis*에서 분리한 plasmin 유사 단백질 분해효소 32.9 kDa (Hahn *et al.*, 2001), 동물류에서는 지렁이 *Lumbricus rubellus*에서 분리한 혈전용해 효소 32 kDa (Jeon *et al.*, 1995), *Katsuwonus pelamis*의 소화관에서 분리한 혈전용해 효소 38 kDa (Nakajima *et al.*, 1993), 해양 녹조류 *Codium divaricatum*에서 분리한 혈전용해 효소 31 kDa (Matsubara *et al.*, 2000)등 뱀독류, 미생물류, 곤충류, 동물류, 녹조류 등에서 분리한 혈전용해 효소와는 다르게 분자량이 더 크게 나타났으나 곤충인 제조로부터 분리한 혈전용해효소 45 kDa (Park and Park, 1998)과는 유사한 크기의 단백질을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 기존에 보고된 혈전용해 효소의 분리에 있어 식물류에 대한 보고가 극히 적어 식물류의 혈전용해 활성에 대한 검토와 강력한 혈전 용해 활성을 가지는 식물류의 탐색이 필요하다고 생각된다, 특히, 식물류도 혈전용해효소의 효과적인 시료가 됨을 알 수 있었으며, 추후 효과적인 정제과정과 분석 실험을 통하여 효소의 특성을 명확히 파악하고 작용기전을 조사해야 할 것으로 생각된다.

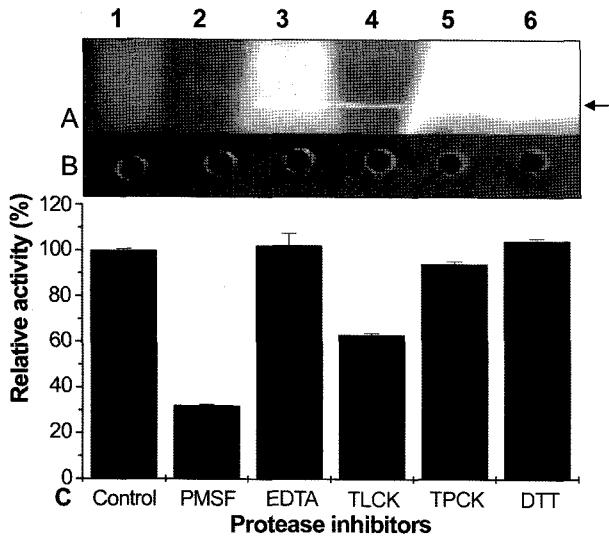


Fig. 4. Effect of protease inhibitors on the fibrinolytic activity from crude extracts of *C. japonica* L. A, fibrin zymography; B, fibrin agarose plate; C, fibrinolytic activity. Lanes and holes, 1, plasmin (0.01 U) as control; 2, 1 mM PMSF; 3, 1mM EDTA, 4, 1 mM TLCK; 5, 1 mM TPCK; 6, 1 mM DTT. Electrophoresis and fibrin agarose plate were performed with 12% SDSpolyacrylamide and 1.2% agarose gel containing 0.12% fibrinogen and 100 NIHU/ml thrombin. Activity was detected by incubation at 37°C for 12 hr.

2) 각종 protease 저해제에 의한 영향

각종 protease 저해제의 영향을 조사하기 위하여 PMSF, EDTA, TLCK, TPCK 그리고 DTT 등을 첨가하여 혈전용해 활성을 fibrin zymography와 fibrin agarose plate로 측정 한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. PMSF, TLCK 및 TPCK는 serine protease inhibitor이고 그 중 TLCK는 trypsin-like serine protease inhibitor 그리고 TPCK는 chemotrypsin-like serine protease inhibitor로 알려져 있으며, EDTA는 강력한 metallo-protease inhibitor이며 DTT는 polypeptide내의 disulfide bond를 절단하는 제제로 알려져 있다. 본 연구의 결과 각종 저해제에 대한 저해효과는 금속이온의 chelate제인 1 mM의 EDTA와 DTT에서는 오히려 대조구인 plasmin (0.01 U)보다 활성이 증진되고, TPCK를 첨가한 경우 약 8%의 저해효과를 보인 반면, PMSF와 TLCK를 1 mM의 농도로 첨가한 경우 활성이 43~69%의 저해효과를 나타낸 것으로 보아 동백유엽의 혈전용해 효소는 trypsin과 유사한 serine protease일 것으로 생각되며, DTT에 의해 활성이 저해되지 않는 것으로 보아 disulfide 결합을 가지지 않는 단일한 polypeptide로 구성된 단백질로 생각된다.

3) 효소활성에 미치는 pH의 영향

효소활성에 미치는 pH의 영향을 fibrin agarose plate에서 조사하였다. Fig. 5에서 보는바와 같이 약간의 산성쪽에 가까

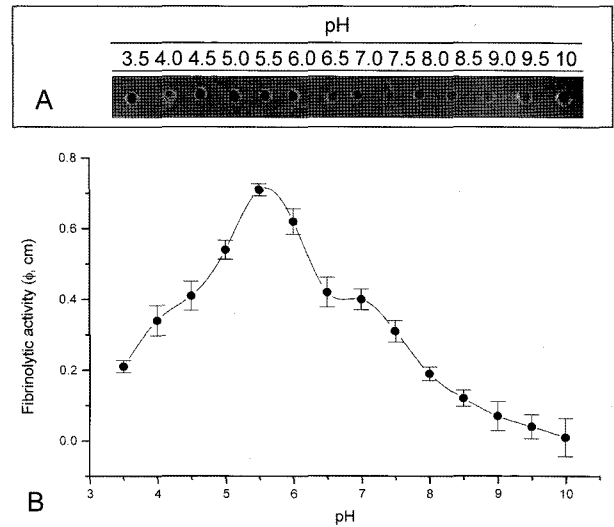


Fig. 5. Effect of pH on the fibrinolytic activity. The protease was incubated at various pH ranging from 3.5 to 10.0 for 30 min in 20 mM Tris-Cl buffer (pH7.4) and the fibrinolytic activity was assayed with fibrin agarose plate as substrate. A, fibrin agarose plate; B, fibrinolytic activity.

운 pH 5.5에서는 최적의 활성을 나타내었으며 serine protease에 전형적인 bell-shape의 양상을 나타내었다. 또한 pH 4.5-7.0까지는 비교적 안정적인 효소활성을 보인 반면 그 밖의 pH에서는 효소활성이 점차적으로 저하되었다. 이는 조류 *Codium divaricatum*에서 분리된 혈전용해효소의 최적 pH 9.0 (Matsubara et al., 2000), 버섯류 *Tricholoma saponaceum*에서 분리된 혈전용해효소의 최적 pH 7.5 (Kim, 2000), 동물류 *Lumbricus rubellus*에서 분리한 혈전용해 효소의 pH 7.0-8.0 (Jeon et al., 1995)에서 분리한 혈전용해 효소보다는 비교적 낮은 pH에서 활성을 나타내었지만 곤충류 *Tenodera sinensis*에서 분리한 plasmin 유사 단백질분해효소의 최적 pH 5.0 (Hahn et al., 2001)에서 최적 활성을 나타내었다는 보고와는 유사한 결과를 나타내었다.

4) 효소활성에 미치는 온도의 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 fibrin agarose plate에서 조사하여 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과 30°C에서 최적 활성을 보였으며 45°C 이하의 온도에서는 비교적 안정적인 효소활성을 보인 반면 45°C 이상의 온도에서는 급격히 효소활성이 저하되어 50°C에서 40%의 효소활성을 보이다가 70°C 이상에서는 20% 이하로 현저히 감소되어 활성을 전혀 나타내지 않았다. 이는 뱀독류 *Agkistrodon piscivorus piscivorus*의 piscivorase I과 II의 65°C (Hahn et al., 1995), 버섯류 *Tricholoma saponaceum*에서 분리된 혈전용해 효소 60°C (Kim, 2000), 동물류 *Lumbricus rubellus*에서 분리한 혈전용해 효소 60°C (Jeon et al., 1995) 그리고 미생물류 일본 전통발효 식품에서

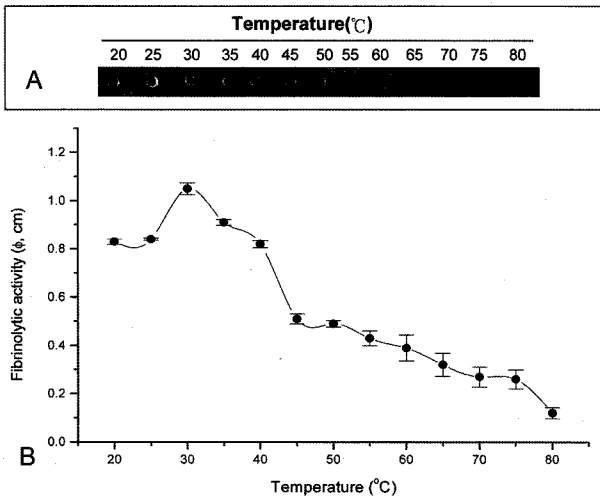


Fig. 6. Effect of temperature on the fibrinolytic activity. The protease was incubated at various temperatures ranging from 30°C to 80°C for 30 min in 20 mM Tris-Cl buffer (pH7.4) and the fibrinolytic activity was assayed with fibrin agarose plate as substrate. A, fibrin agarose plate; B, fibrinolytic activity.

분리한 katsuwoxinase 37°C (Sumi *et al.*, 1995)에서 분리한 혈전용해 효소보다는 비교적 낮은 온도에서 활성을 나타내었지만 곤충류 *Tenodera sinensis*에서 분리한 plasmin 유사 단백질 분해효소 30°C (Hahn *et al.*, 2001)활성이 강하였다는 보고와는 유사한 결과를 나타내었다.

적 요

미생물 및 동물에 비해 식물에서는 혈전용해효소에 대한 연구가 매우 부족한 실정이며, 기존의 혈전용해효소가 가지는 혈전에 대한 비특이적, 부작용, 고가 등의 단점을 해결할 수 있는 새로운 혈전용해효소의 개발을 위하여 동백의 종자, 종피, 유엽 그리고 성엽으로부터 추출된 수용성 단백질의 혈전용해 활성을 조사하였다. 각각의 동백부위로부터 추출된 조효소 용액은 기존 혈전 용해효소인 plasmin과 양성 대조군으로 하여 비교하여 fibrin agarose plate로 확인한 결과 fibrin clot을 효과적으로 분해하였다. 그 중 단백질 분해효소의 활성이 다른 부위보다 20-33배로 높았던 동백종자와 종피의 수용성 추출물의 혈전용해활성은 양성 대조군인 plasmin과 비교하여 1.6-2.0 배의 높은 활성을 나타내었다. 전체 수용성 단백질은 30-80% 황산암모늄을 이용하여 농축하였으며 혈전용해효소는 fibrin zymography를 수행하여 확인하였다. SDS-PAGE에 의하여 동백유엽의 혈전용해효소 분자량을 측정된 결과 45 kDa으로 단일 polypeptide임을 확인하였으며, 각종 protease 저해제에 의한 영향을 조사한 결과 PMSF, 그리고 TLCK에 강력하게 저해되는 것으로 보아 동백유엽의 혈전용해효소는 trypsin과 유사한 serine protease의 하나로 생각되었다. 그러나 EDTA와

DTT처리에 의해서는 효소활성의 저해가 두드러지게 나타나지 않고 오히려 증진된 양상을 확인할 수 있었다. 또한, 효소 활성에 미치는 pH 및 온도의 효과는 약간의 산성쪽에 가까운 pH 5.5와 30°C에서는 최적의 활성을 나타내었으며, 45°C 이상의 온도에서는 효소활성이 급격히 감소하였다. 이상의 모든 결과로 볼 때 동백유엽의 혈전용해효소는 trypsin과 유사한 serine protease에 속하는 혈전용해효소임을 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

Astrup T, Mullertz S (1952) The fibrin agarose plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys. 40: 346-351.

Bradford MM (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Chudzinski-Tavassi AM, Kelen EM, Paula-Rosa AP, S. Loyau CA, Sampaio C, Bon E, Angles C (1998) Fibrino (geno) lytic properties of purified hementerin, a metallo-proteinase from the leech *Haementeria depressa*. Thromb. Haemost. 80:155-160.

D'Costa SS, Boyle MDP (1998) Interaction of a group A *Streptococcus* within human plasma results in assembly of a surface plasminogen activator that contributes to occupancy of surface plasmin-binding structures, Microbial Pathogenesis, 24: 341-349.

Fan Q, Wu C, Li L, Fan R, Wu C, Hou Q, He R (2001) Some features of intestinal absorption of intact fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus*, Biochimica et Biochemica Acta, 1526:286-292.

Guo YW, Chang TY, Lin KT, Liu HW, Shih KC, Cheng SH (2001) Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a β -fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu), Protein Expression and Purification, 23:483-490.

Hahn BS, Chang IM, Kim YS (1995) Purification and characterization of picivorase I and II, the fibrinolytic enzymes from eastern cottonmouth moccasin venom (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*), Toxicon, 33(7):929-941.

Hahn BS, Cho SY, Ahn MY, Kim YS (2001) Purification and characterization of plasmin-like protease from *Tenodera sinensis* (Chinese mantis), Insect Biochemistry and molecular biology, 31:573-581.

Holden RW (1990) Plasminogen activators: pharmacology and therapy, Radiology, 174:993-1001.

Hrzenjak T, Popovic M, Bozic T, Grdisa M, Kobrehel D, Tiska-Rudman L (1998) Fibrinolytic and anticoagulative activities from the earthworm *Eisenia foetida*. Comp. Biochem.

- Physiol. B, 119:825-832.
- Jeon OH, Moon WJ, Kim DS** (1995) An anticoagulant/fibrinolytic protease from *Lumbricus rubellus*. J. Biochem. Mol. Biol., 28(2):138-142.
- Jin Y, Lu QM, Wei JF, Li DS, Wang WY, Xiong YL** (2001) Purification and characterization of jerdofibrase, a serine protease from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake, Toxicon, 39: 1203-1210.
- Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK, Kong IS** (1997) Purification and Characterization of a novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. KA38 Originated from Fermented Fish. J. Fermentation and Bioengineering, 84(4): 307-312.
- Kim JH** (2000) Purification and Characterization of Fibrinolytic enzyme from *Tricholoma saponaceum*. The Korean Society of Mycology, 28(1):60-65.
- Kim JH, Kim YS** (1998) Purification and Characterization of Fibrinolytic enzyme from *Armillariella mellea*, The Korean Society of Mycology, 26(4):583-588.
- Kim SH, Choi NS, Lee WY** (1998) Fibrin Zymography: A Direct Analysis of Fibrinolytic Enzymes on Gels. Analytical Biochemistry, 263:115-116.
- Kim YT, Kim WK, Oh HS** (1995) Screening and Identification of the Fibrinolytic Bacterial Strain from ChungKook-jang. Kor. J. Microbiol. Biotechnol., 2(3):1-5.
- Koh YS, Chung KH, Kim DS** (2001) Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom, Toxicon, 39:555-560.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227:680-685.
- Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM** (2005) Antimicrobial and Antioxidant Activity of Extracts from Different Sections of Nature *Camellia japonica* L in Korea.. Korean Journal of Medicinal Crop Science 14(1):1-7.
- Matsubara K, Hori K, Matsuura Y, Miyazawa K** (2000) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*, Comp. Biochem. and Physiol., 125: 137-143.
- Mullertz S, Lassen M** (1953) An activator system in blood indispensable for formation of plasmin by streptokinase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82:264.
- Nakajima N, Taya N, Sumi H** (1993) Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive tract (shiokara): purification and characterization, Biosci. Biotech. Biochem., 57(9):1604-1605.
- Park HJ, Park SD** (1998) Purification and characteristics of fibrinolytic enzyme having molecular weight 45,000 dalton from *Holotrachia* extract, J. of Herbology, 13(1):119-137.
- Patton LM, Pretzer D, Schulteis BS, Saggart KD, Tennant KD, Ahmed NK** (1993) J. Biochem. Biophys. Met., 27(1):11-23.
- Reed GL, Lin LF, Parhami-Seren B, Kussie P** (1995) Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of streptokinase plasminogen activator complex, Biochemistry, 34:10266-10271.
- Siigur J, Samuel M, Tonismagi K, Subbi J, Siigur E, Tu AT** (1998) Biochemical characterization of lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* snake venom, Thrombosis research, 90:39-49.
- Sumi H, Seiki M, Morimoto N, Tsushima H, Maruyama M, Mihara H** (1985) Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. Enzyme, 33:121-127.
- Sumi H, Nakajima N, Yatagai C** (1995) A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack Shiokara, a Japanese traditional fermented food, Comp. Biochem. Physiol B, 112(3):543-547.
- Tabance N, Kirimer N, Demirci B, Demirci F, Baser KHC** (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and enantiomeric distribution of borneol. J. Agric. Food Chem. 49:4300-4303.
- Xiuxia L, Jiashu C, Yingna Z, Pengxin Q, Grangmei Y** (2001) Purification and biochemical characterization of F IIa a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom, Toxicon, 39:1133-1139.
- Yoshikawa M, Harada E, Murakami T, Matsuda H, Yamahara J, Murakami N** (1994) Camellia saponins B1, B2, C1 and C2, new type inhibitors of ethanol absorption in rats from the seeds of *Camellia japonica* L. Chem. Pharm. Bull., 42:742.